FR

Anti-EBV VCA IgM ELISA

Test immunoenzymatique pour la détection *in vitro* des anticorps IgM dirigés contre les antigènes p23/p18 de la capside du virus (VCA) d'Epstein-Barr (EBV) dans le sérum ou le plasma

Conditionnement

REF [3] 807 018 96 tests IVD coffret de tests complets

Usage prévu

Le test Anti-EBV VCA IgM ELISA est un test de diagnostic *in vitro* IVD pour la détection des anticorps IgM dirigés contre les antigènes p23 et p18 de la VCA de l'EBV. Les résultats obtenus dans ce test, associés à d'autres données cliniques et d'autres informations sur le patient obtenues dans des analyses d'autres anticorps spécifiques du virus d'Epstein-Barr comme les tests anti-EA IgG/IgM, anti-VCA IgG et anti-EBNA-1 IgG, aident à poser le diagnostic sérologique d'une infection par EBV. Une primo-infection par EBV peut donner une mononucléose infectieuse (IM = maladie de Pfeiffer, 1,2). La maladie atteint le plus souvent les grands adolescents et les jeunes adultes. La maladie aiguë peut donner les symptômes suivants: fièvre, angine, amygdalite, lymphadénopathie, malaise, maux de tête, myalgies, spléno- et hépatomégalie, éruption cutanée et leucocytose (2). D'autres agents pathogènes infectieux comme le cytomégalovirus, Toxoplasma gondii, le virus de la rubéole, les virus de l'hépatite, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) peuvent donner des symptômes similaires. On peut utiliser le test Anti-EBV VCA IgM ELISA pour l'identification d'une infection par EBV.

Principe de la méthode

Le test Anti-EBV VCA IgM ELISA est un test immunoenzymatique de capture, avec antigène adsorbé (ELISA) spécifique des IgM (chaîne µ), très sensible, pour la détection d'anticorps spécifiques de l'EBV dans le sérum ou le plasma (4). Pendant la première étape d'incubation, les anticorps IgM de l'échantillon vont se lier à la MTP. Les autres types d'immunoglobulines seront éliminés par lavage. Pendant une seconde incubation, les anticorps IgM immobilisés spécifiques de p23 et p18 de la VCA seront détectés. Pour cela, un conjugué antigène-enzyme est ajouté. Les p23-18 recombinants (rec.) sont marqués directement et de façon covalente par de la peroxydase de raifort (HRP). Le conjugué lié de façon non spécifique est éliminé par une autre étape de lavage. Pendant la dernière incubation, la solution de substrat (TMB, 3,3´5,5´-tétraméthylbenzidine) est introduite dans les puits. La réaction enzymatique est arrêtée par addition d'acide sulfurique (la couleur passe du bleu au jaune) et la densité optique est mesurée avec un spectrophotomètre à 450 nm et avec une longueur d'onde de référence de 615-690 nm.

La trousse contient

MTP	1	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés par un anticorps IgM anti-humain polyclonal (concentration: > 0,5 µg/ml).
NC	1,2 ml	**Contrôle EBV IgM-négatif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
PC	1,2 ml	**Contrôle EBV IgM-positif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
DIL	45 ml	**Diluant de l'échantillon** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,01 % de sulfate de néomycine, 0,03 % de chloramphénicol
CONJ	15 ml	**Conjugué de la protéine de fusion p23-18 Rec.** (prêt à l'emploi) Conservateur: 0,025% de pénicilline V, 0,025% de sulfate de streptomycine, 0.2% de Proclin-300
WB	6 ml	**Tampon de lavage concentré** (500 x) conservateur: 0,01 % de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol
SUB	13 ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB) < 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	15 ml	**arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	**Sachet de conservation:** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées.
FOL	3	**Feuilles transparentes auto-adhésives:** Feuilles transparentes auto-adhésives pour recouvrir les puits des microplaques pendant l'incubation.
	1	**Notice du coffret**

Conservateurs: concentration totale < 0,11%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques (avec lavage de fond) et incubateur à 37°C pour les MTP.

Avertissement et précautions

Ne pas incorporer de réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter tous les échantillons et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les contrôles sont négatifs pour anti-HIV 1/2, anti-HCV, HB_SAg, anti-syphilis et les transaminases élevées. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement les MTP utilisées et les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiqumenet contrôlées. En cas de trousse d'origine détériorée, en informer le fabricant.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2-8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2-8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium avec un déshydratant et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées avec le déshydratant dans le sachet refermable et les conserver ainsi à 2-8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Préparation des réactifs

Diluer le tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (1:501). Le tampon ainsi préparé est stable pendant une semaine, conservé à 2-8°C. Tous les autres composants du test sont prêts à l'emploi. Tous les réactifs sont spécifiques d'un lot ; ne pas les utiliser avec des trousses d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma frais, sans hémolyse. Des échantillons de sérum ou de plasma à forte lipémie, ictériques ou à contamination microbienne et des préparations d'immunoglobuline concentrées risquent de donner des résultats de test non fiables. Eviter de congeler et décongeler les échantillons à plusieurs reprises. Si les échantillons doivent être transportés, les emballer conformément aux exigences réglementaires pour le transport de matières infectieuses. Ne pas inactiver les échantillons, car il pourrait se produire des réactions non-spécifiques.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage).

Dilution des échantillons au 1:21 avec prédilution dans des tubes

Diluer les contrôles PC, NC et les échantillons au 1:21 dans un tube (par exemple, 25 µl de contrôle ou d'échantillon + 500 µl de DIL). Bien mélanger.

Dilution des échantillons au 1:21 avec dilution directement dans la plaque

Pipeter 200 µl de DIL dans chaque puits. Cette dilution directement dans la microplaque convient tout particulièrement bien en cas d'utilisation de dispositifs de pipetage automatiques. Si la dilution est effectuée directement dans la plaque manuellement, il est important d'éviter la fixation non-spécifique de protéines en observant les étapes suivantes: Pipeter premièrement 200 µl de DIL dans le puits, puis ajouter 10 µl d'échantillon ou de témoins. Mélanger de 5 à 7 fois quand on ajoute les 10 µl d'échantillon ou de témoins.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

W1: laver 5 fois avec le tampon de lavage. Pour cela, éliminer le liquide du puits et distribuer 300 µl de tampon de lavage. Remplir le puits avec au moins 250 µl de tampon de lavage (volume total 550 µl). Répéter cette procédure de lavage 5 fois. Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Calcul de la détermination qualitative

Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), soustraire la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles et des échantillons. Extinction moyenne des blancs ≦ 0,150. Après soustraction du blanc, les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères de validité suivants:

DO moyenne de NC: ≦ 0,200 DO moyenne de PC: ≧ 0,400

Calcul de la valeur seuil et de la zone grise

La valeur seuil est calculée à partir de la DO moyenne des contrôles négatifs (NC $\overline{X}$) à laquelle on ajoute 0,200. Valeur seuil = NC $\overline{X}$ + 0,200. La zone grise s'étend entre la valeur seuil et la valeur seuil moins 10%.

CE

BIO-RAD

Procédure de pipetage pour la détermination qualitative d'IgM (dilution en tube)

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi.				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1/B1	C1**/** D1	E1/ F1	G1...
Blanc	200 DIL			
NC double test	--	200 NC	--	--
PC double test	--	--	200 PC	--
Echantillon 1:21	--	--	--	200
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 1 mn**, 37 ± 1° C	Processeur*: **60 ± 1 mn**, 37 ± 1 °C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ±1° C	Processeur*: **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 1 mn**, à la tempé-rature ambiante dans l'obscurité	Processeur*: **15 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615 - 690 nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Interprétation du résultat

Les échantillons ayant une valeur d'extinction inférieure à la zone grise sont considérés comme négatifs. Si un échantillon a une valeur d'extinction égale ou supérieure à la zone grise, il est considéré comme positif pour les anticorps IgM spécifiques de la VCA de l'EBV. Si la valeur de DO de l'échantillon retesté est dans la zone grise (résultat douteux), nous recommandons de demander un nouveau prélèvement.

Interprétation de résultats positifs pour le test Anti EBV VCA IgM.

Etat de l'infection	**IgM - VCA**	**IgG - VCA**	**IgG - EBNA**	**Informations**
Séronégatif	-	-	-	**1**
Primo-infection				
Phase précoce	+	-	-	-
Phase aiguë	+	+	-	-
Phase tardive	-	+	-	**2**
Après infection				
Infection ancienne	-	+	+	-
IgM persistantes	+	+	+	**3**
Réactivation	-	+	+	**4**
Non défini				
Non plausible	-	-	+	**5**
Non plausible	+	-	+	**5**

1: Dans la toute première phase d'une infection primaire, la sérologie peut être encore négative. Il est recommandé, dans le cas d'un résultat d'IgM anti-VCA dans la zone grise de traiter l'échantillon comme un cas de "possible phase précoce d'une primo-infection" et de confirmer ou infirmer ce résultat en analysant un autre échantillon prélevé plus tard.

2: Il existe une exception dans le cas d'un patient immunodéprimé ou immunoprive, où ce résultat peut être secondaire à la perte des IgG d'EBNA. Dans cette situation, il est recommandé d'interpréter les valeurs des IgG d'EBNA trouvées dans la zone grise comme étant positives et poser comme diagnostic pour l'échantillon "infection ancienne".

3: Les IgM persistent dans de nombreux cas pendant plus de six mois et peuvent, à ce moment-là, coïncider avec un résultat positif pour les IgG d'EBNA. Cependant, on ne peut donner comme résultat "phase tardive d'une primo-infection" que dans le cas d'un très faible EBNA (DO < 0,500). Dans le cas contraire, le diagnostic est "infection ancienne".

4: Il est impossible de définir une réactivation au moyen d'une sérologie de VCA. La quantification des IgG de VCA peut apporter une aide. Les valeurs très supérieures à la plage normale (> 2,500 RU/ml) sont suspectes. Le marqueur classique pour la définition sérologique de la réactivation de l'EBV est constitué par les anticorps IgG dirigés contre l'antigène précoce (EA) (par exemple anti-EBV EA IgG ELISA, N° de catalogue 807 016). Les IgG anti-EA doivent être déterminés en outre, en cas de suspicion d'une réactivation d'EBV.

5: Les schémas de réactivité non plausibles sont des situations extrêmement peu probables qui n'ont pas été mises en évidence dans les études cliniques. Les valeurs d'IgG de VCA dans la zone grise devraient être définies comme positives. L'interprétation, dans ce cas, est « infection ancienne ». Pour les valeurs d'IgG de VCA inférieures à la zone grise, il conviendra de recommencer totalement la sérologie de l'EBV pour éliminer toute erreur dans la procédure du test. En cas de résultat non plausible à nouveau, il est recommandé de demander un nouveau prélèvement. Si le résultat se confirme, le diagnostic "infection ancienne" sera posé.

Limitations de la méthode

Un résultat de test négatif obtenu dans le test Anti-EBV VCA IgM ELISA n'exclut pas totalement une infection par l'EBV. Les résultats du test doivent être utilisés conjointement avec les informations disponibles sur l'évaluation clinique du patient et les autres procédures de diagnostic existantes. Les résultats des tests de patients immunodéprimés peuvent être difficiles à interpréter. Des résultats de test positifs peuvent ne pas être valides chez des personnes ayant reçu des transfusions sanguines ou d'autres produits sanguins au cours des derniers mois. Le test Anti-EBV VCA IgM ELISA a été analysé avec les échantillons suivants, susceptibles de donner une réaction croisée: sérums anti-rhumatoïdes (23), sérums anti-virus de l'hépatite B-positifs, phase aiguë (6), sérums anti-virus de l'hépatite C-positifs, phase aiguë (6), sérums anti-virus de la varicelle-positifs, phase aiguë (3), sérums anti-cytomégalovirus-positifs, phase aiguë (3) et sérums anti-toxoplasmose positifs, phase aiguë (4). Un échantillon HCV-positif a donné un résultat positif dans le test Anti-EBV VCA IgM ELISA.

Performance

Les résultats obtenus dans le test Anti EBV VCA IgM associés à d'autres tests tels que anti-VCA IgG et anti-EBNA-1 IgG facilitent le diagnostic sérologique d'une infection par l'EBV. Sur 69 sérums de patients primo-infectés par l'EBV, 67 (97,1%) étaient positifs (5). Tous les échantillons séronégatifs (46) ont été trouvés négatifs (spécificité 100%) par le test Anti EBV VCA IgM ELISA (5).

Etude de la précision

La variabilité intra-série du test Anti-EBV VCA IgM ELISA a été évaluée en pipetant un échantillon négatif, un échantillon faiblement réactif et un échantillon très réactif dans une même série, chacun dans 6 puits. Nous avons obtenu les coefficients de variation (CV) respectifs suivants: 11,7%, 2,3% et 4,4%.

La variabilité inter-séries a été évaluée en testant trois échantillons de réactivité négative, faible et forte chacun dans six puits et dans trois séries successives. Nous avons obtenu le coefficient (CV) suivant: 7,4%, 3,5% et 4,8%.

Littérature

1. Linde, A. (1992). *Rev. Med. Microbiol*. 3, 43-51.
2. Straus, S., Cohen, J.I., Tosato, G. et Meier, J. (1993). *Ann. Int. Med.* 118, 45-58.
3. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
4. Hinderer, W., Lang D., Rothe M., Vornhagen R., Sonneborn H-H., et Wolf H. (1999), *J. of Clin. Microbiol*., Vol. 37, No. 10, p3239-3244.
5. Färber, I., Hinderer, W., Rothe M., Lang D., et Wutzler, P. (2001). *J. of Med. Virol.* 63, 271-276.

Guide de dépannage

1) Taux élevé, et inattendu, de résultats réactifs. Des échantillons ou des contrôles ont été pipetés avant le pipetage de DIL ou bien le mélange a été insuffisant.
2) Valeur moyenne du blanc supérieure au critère de validité, DO ≧ 0,150:
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage: Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Si l'on utilise un dispositif de lavage manuel, effectuer 7 cycles de lavage de l'étape de lavage. Utiliser le WB de Bio-Rad contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde: une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
3) Coloration jaune dans tous les puits: (voir 2a, 2b).
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage.
   b) DIL ou CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
4) Valeur de DO moyenne de PC inférieure à ≤0,400:
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage: lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC ou 3b.
5) Valeur de DO moyenne de NC supérieure à ≧ 0,200: (voir 1 et 2 a-d)
   a) NC n'a pas été pipeté après le pipetage des échantillons ; pipeter tous les échantillons avant de pipeter les blancs et les contrôles.
   b) Contamination par le couvercle du PC.

Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany
Tel.: +49-6103-801-95, Fax: +49-6103-801-724
www.bio-rad.com, techsupport.bmd@bio-rad.com

BIO-RAD

CE

187830/07 – 07/2010